Paris

ORSAY

Série A N°

N° d'ordre : 518

"EFFET PHOTODYNAMIQUE AU COURS DE L'ADAPTATION

RESPIRATOIRE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE"

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences physiques enregistrée au C.N.R.S. sous le n° AO 1937.

GUERIN Bernard

soutenue le 27 Juin 1969 à la Faculté des Sciences d'ORSAY

devant le jury :

MM. E. LEDERER
P.P. SLONIMSKI
Mme P. CHAIX
M. M. KAMEN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523705_0089

Reprinted from
Biochimica et Biophysica Acta
Elsevier Publishing Company
Amsterdam
Printed in The Netherlands

BBA 45619

PHOTOINHIBITION DE L'ADAPTATION RESPIRATOIRE CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

II. LE SPECTRE D'ACTION

BERNARD GUERIN**, ET ROGER JACQUES***

** *Institut de Biochimie de la Faculté des Sciences d'Orsay, Orsay, et* *** *Laboratoire de Génétique Physiologique, C.N.R.S., Gif-sur Yvette, Essonne*
Laboratoire du Phytotron, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (France)

(Reçu le 2 août, 1967)

SUMMARY

Photoinhibition of respiratory adaptation of Saccharomyces cerevisiae

The present work deals with the action spectrum for photoinhibition of the respiratory adaptation in yeast. Four peaks (at 500, 540, 575 and 630 mμ) and a highly active spectral zone at 404 mμ were detected. The action spectrum has a striking similarity to the absorption spectrum for porphyrins. The mechanism of the photoinhibition is briefly discussed.

INTRODUCTION

Dans une précédente publication[1], nous avons montré que la formation des enzymes respiratoires de la levure, induite par l'oxygène[2,3] est inhibée par la lumière visible. Une telle irradiation est sans effet sur la levure déjà adaptée. L'illumination provoque un retard de l'adaptation qui peut être évalué en replaçant les cellules à l'obscurité. Nous avons pu montrer que la période sensible à la lumière se situe au cours de la première heure de l'aération des levures anaérobies[4].

Le présent travail a pour but d'établir le spectre d'action du phénomène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche. Saccharomyces cerevisiae, "Yeast Foam".

Conditions de culture. Le milieu et les conditions de culture en anaérobiose ont été décrits précédemment[4].

Préparation et traitement des échantillons. Les levures sont récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie (environ à 8 générations), centrifugées et lavées deux fois à l'eau froide. Le culot est mis en suspension à raison de 0.7 mg poids sec par ml, dans le tampon suivant: phosphate disodique, phtalate acide de potassium,

* Ce travail constitue une partie de la Thèse de Doctorat ès-Sciences physiques de BERNARD GUERIN, Faculté des Sciences d'Orsay, enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro A.o.1937.

acide succinique, 0.05 M (pH 4.7), glucose 2 %. Les échantillons sont irradiés au début de l'aération, par fraction de 10 ml, à l'aide de l'illuminateur spectral à réseaux décrit par JACQUES *et al.*[5]. Cet appareil a l'avantage de fournir des plages spectrales de dimensions réglables; tout en gardant une pureté monochromatique convenable, le flux lumineux est très élevé. Les irradiations isoquantiques sont effectuées à 15° pendant 3 h simultanément pour 6 à 8 longueurs d'onde; cette méthode nous a permis d'étudier avec suffisamment de finesse les régions spectrales de faible efficacité par comparaison directe des inhibitions observées. L'éclairement énergétique pour chaque longueur d'onde est mesuré à l'aide d'une thermopile (Jacobsen–Randon) couplée à un galvanomètre. L'aération et l'homogénéité de la suspension de levures sont assurées par agitation magnétique. Un témoin est gardé à l'obscurité dans les mêmes conditions.

Test biologique. Après ce traitement, l'adaptation respiratoire est suivie à 28° et à l'obscurité en mesurant la vitesse de consommation de l'oxygène en fonction du temps par la méthode manométrique de Warburg. La lumière provoque un retard de l'adaptation[4]. La Fig. 1 représente l'évolution du Q_{O_2}, en fonction du temps, de levures gardées à l'obscurité ou illuminées précédemment 3 h à 404 mμ ou à 575 mμ.

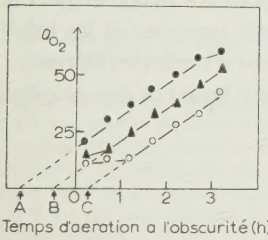

Fig. 1. Mesure de l'inhibition. Les levures cultivées en anaérobiose sont récoltées en phase exponentielle de croissance (à 8 générations), lavées 2 fois à l'eau froide et suspendues dans le tampon glucosé. Un échantillon est illuminé à 404 mμ, un autre à 575 mμ durant les trois premières heures de l'aération. La température est réglée à 15°. Pendant ce temps un témoin est gardé à l'obscurité dans les mêmes conditions de température et d'agitation. L'adaptation respiratoire est ensuite suivie à 28° et à l'obscurité en mesurant la vitesse de consommation de l'oxygène en fonction du temps. Cette vitesse est exprimée en Q_{O_2}, c'est à dire en μl O_2 consommés par h et par mg poids sec de levures. Courbes d'adaptation de levures préincubées: ●—●, à l'obscurité; ▲—▲, en lumière monochromatique, $\lambda = 575$ mμ, $E = 10000$ ergs/cm² par sec; ○—○, $\lambda = 404$ mμ, $E = 3000$ ergs/cm²/par sec. Chaque courbe est extrapolée pour une vitesse nulle (– – – –). L'inhibition est mesurée sur l'axe des abscisses par le retard du début de l'adaptation par rapport au témoin gardé à l'obscurité. Ce retard est égal au segment AB pour l'échantillon illuminé à 575 mμ, et au segment AC pour celui illuminé à 404 mμ.

L'activité des zones spectrales étudiées est évaluée de la manière suivante: la partie linéaire de la courbe (Fig. 1), représentant l'augmentation de la vitesse de respiration au cours du temps, est extrapolée à une vitesse nulle pour le témoin et pour l'échantillon irradié; on mesure sur l'axe des abscisses le décalage dans le temps du début de l'adaptation; ce retard (mesuré par le segment AB pour 575 mμ et AC pour 404 mμ) rend compte de l'activité d'une irradiation monochromatique pour une énergie donnée.

Ce test n'est valable qu'à certaines conditions: (1) Les courbes d'adaptation des échantillons, irradiés ou non, doivent comporter une partie strictement linéaire. Ceci est réalisé en récoltant les levures en phase exponentielle de croissance anaérobie. (2) Pour une radiation donnée, l'énergie employée doit être comprise entre deux

limites définis; l'une au dessous de laquelle le retard produit manque de netteté et dépend de la précision de la méthode, l'autre au dessus de laquelle l'inhibition est irréversible[4].

La précision de la méthode dépendant de la linéarité des courbes est telle que le point d'intersection du prolongement de la droite et de l'axe des abscisses est compris à l'intérieur d'un segment correspondant à 15 min.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après avoir réalisé un spectre isoquantique avec 8 longueurs d'onde entre 400 mμ et 650 mμ, réglé à 15000 ergs/cm² par sec à 575 mμ, 2 zones d'activité ont été décelées: l'une très efficace à 404 mμ, l'autre beaucoup plus faible à 575 mμ. A 404 mμ, il s'est avéré que l'énergie utilisée provoquait une inhibition irréversible de l'adaptation. En conséquence, on a étudié séparément les zones comprises entre 400 mμ et 450 mμ d'une part et entre 450 mμ et 650 mμ d'autre part. Pour l'étude du spectre d'action entre 400 mμ et 450 mμ l'irradiation isoquantique a été réglée de telle sorte que l'éclairement énergétique à 404 mμ soit de 5000 ergs/cm² par sec. Par contre, pour la zone comprise entre 450 mμ et 650 mμ l'éclairement était de 15000 ergs/cm² par sec à 575 mμ. Un grand nombre de longueurs d'onde ont été essayées et les inhibitions observées ont été rapportées à celle obtenue à une longueur d'onde de référence: 404 mμ pour la première zone et 575 mμ pour la seconde. Les largeurs des bandes passantes sont données dans le Tableau I.

TABLEAU I

LARGEUR DES BANDES

	Longueurs d'onde en mμ		
	404	*540*	*650*
Bandes passantes en mμ à mi-hauteur de la courbe d'émission	13	9	7

Nous avons choisi comme unité d'efficacité le retard de l'adaptation provoqué par une illumination de 3 h à 575 mμ pour un éclairement énergétique de 15000 ergs/cm² par sec: ce retard est en moyenne égal à 1 h. Afin de tracer le spectre d'action dans son ensemble nous avons comparé les efficacités entre 404 mμ et 575 mμ. Pour cela, nous avons mesuré les inhibitions de l'adaptation obtenues à ces 2 longueurs d'onde en fonction de la dose lumineuse (Fig. 2). Dans les deux cas, l'inhibition est proportionnelle à la dose. Le rapport des efficacités a été évalué sur ces courbes: pour obtenir une inhibition correspondant à un retard de l'adaptation de 1 h, il faut 7.5 fois plus d'énergie, soit environ 11 fois plus de photons à 575 mμ qu'à 404 mμ. Nous avons attribué à la longueur d'onde 404 mμ une efficacité de 11. Le spectre d'action est resprésenté par la Fig. 3.

Les maximums d'efficacité (500, 540, 575 et 630 mμ) et la très grande activité à 404 mμ démontrent la participation d'une porphyrine neutre au phénomène d'inhibition.

Par quel mécanisme la lumière inhibe-t-elle l'adaptation respiratoire? Nous

savons que la biosynthèse de tous les cytochromes est inhibée par la lumière[1]. Ceci signifie que la porphyrine présente en anaérobiose[6] photosensibilise au début de l'aération un système commun à toutes ces biosynthèses. Elle pourrait donc agir soit sur la biosynthèse des protéines en général, soit sur la formation des groupements hématiniques. La deuxième hypothèse semble la plus probable. En effet, nous avons pu

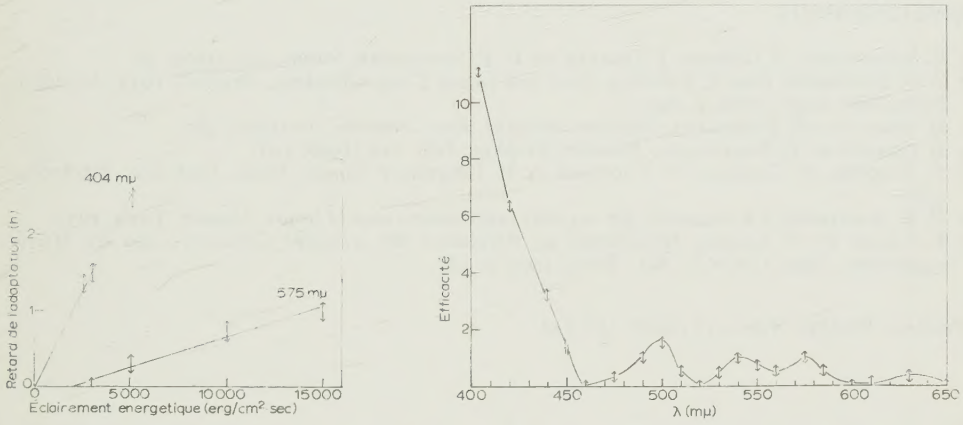

Fig. 2. Mesure de l'inhibition en fonction de la dose. Plusieurs échantillons sont illuminés à 404 mμ ou à 575 mμ à des doses variables dans chaque cas. Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la légende de la Fig. 1. Pour obtenir des doses de lumière variables, on irradie à des éclairements différents tout en gardant un temps d'illumination constant de 3 h. Le retard de l'adaptation, provoqué par la lumière, est mesuré pour chaque échantillon par rapport au témoin gardé à l'obscurité selon le procédé décrit. Ce retard est porté en fonction de l'éclairement.

Fig. 3. Spectre d'action. Le spectre d'action a été établi séparément dans les 2 zones spectrales suivantes: de 400 mμ à 450 mμ et de 450 mμ à 650 mμ. Dans chacune de ces zones, nous avons procédé à des éclairements isoquantiques pour les radiations monochromatiques étudiées. Nous avons comparé le retard de l'adaptation produit par la lumière à celui observé à 404 mμ pour la première zone et à 575 mμ pour la seconde. Le retard observé à 575 mμ a été pris comme unité d'action. Pour tracer le spectre d'action total entre 400 mμ et 650 mμ nous avons attribué à la radiation 404 mμ une efficacité de 11. Les efficacités ainsi obtenues ont été portées en fonction de la longueur d'onde. Les flèches verticales rendent compte de la précision du test biologique. La discontinuité de la courbe à 450 mμ exprime le fait que ces 2 zones ont été étudiées séparément.

montrer, par des expériences préliminaires, en utilisant des surnageants obtenus par centrifugation à 105000 × *g* d'un homogénat de levures anaérobies, que la synthèse de la protoporphyrine[7] est inhibée en présence de lumière et d'oxygène. Des études plus approfondies sur le mécanisme de la photoinhibition sont actuellement en cours.

RÉSUMÉ

Le spectre d'action de la photoinhibition de l'adaptation respiratoire chez la levure a été étudié. Quatre maximums d'activité (à 500, 540, 575 et 630 mμ) et une zone spectrale de très grande efficacité à 404 mμ ont été mis en évidence. Le spectre d'action correspond à un spectre d'absorption de porphyrine neutre. Un mécanisme possible de l'action de la lumière sur l'adaptation est brièvement discuté.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Professeur SLONIMSKI de l'intérêt constant porté à ce travail. Nous avons beaucoup apprécié la collaboration technique de Mademoiselle D. FENEUX.

BIBLIOGRAPHIE

1 E. SULKOWSKI, B. GUERIN, J. DEFAYE ET P. P. SLONIMSKI, *Nature*, 202 (1964) 36.
2 P. P. SLONIMSKI, dans C. LIEBECQ, *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem., Brussels, 1955*, Academic Press, New York, 1956, p. 242.
3 M. SOMLO ET H. FUKUHARA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19 (1965) 587.
4 B. GUERIN ET E. SULKOWSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 129 (1966) 193.
5 R. JACQUES, R. CHABBAL, P. CHOUARD ET P. JACQUINOT, *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 259 (1964) 1581.
6 P. P. SLONIMSKI, *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson, Paris, 1953.
7 P. CHAIX ET P. LABBE, *Mécanismes de Régulation des Activités Cellulaires chez les Microorganismes, 1963*, C.N.R.S., Ed., Paris, 1965, p. 481.